

⑫公開特許公報(A)

平4-99784

⑤Int.Cl.⁵

C 07 F 9/10

識別記号

庁内整理番号

A 7731-4H

⑬公開 平成4年(1992)3月31日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全5頁)

④発明の名称 ホスファチジルコリンの製造法

⑪特 願 平2-217917

⑫出 願 平2(1990)8月17日

⑬発明者 川島 正毅 東京都葛飾区堀切4丁目66番1号 ミヨシ油脂株式会社内
 ⑭発明者 二宮 守男 東京都葛飾区堀切4丁目66番1号 ミヨシ油脂株式会社内
 ⑮出願人 ミヨシ油脂株式会社 東京都葛飾区堀切4丁目66番1号

明 稞 苦

発明の名称 ホスファチジルコリンの製造法

特許請求の範囲

1. グリセロホスホリルコリンと脂肪酸無水物とを低級アルコールに溶解した後、低級アルコールを留去し、次いで非プロトン性溶媒と塩基性触媒とを加えて反応することを特徴とするホスファチジルコリンの製造法。

発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はホスファチジルコリンの新規な製造法に関する。

(従来の技術)

大豆、卵黄等に含まれるレシチンは乳化性を有し、食品、化粧品、塗料等の乳化剤として広く利用されている。またレシチンの生理活性作用に着目し、機能性食品、医薬品等への応用が進められている。さらにレシチンを含むリン脂質を水に分散すると、2分子膜構造の閉鎖小胞体であるリボソームが形成され、このリボソームは薬物送達シ

ステムや、臨床診断薬等の素材として有用である。

この様に有用なレシチンを製造する試み、即ちホスファチジルコリンの製造法が種々検討され、報告されている。

例えばホスファチジルコリンの製造法としては、(1)グリセロホスホリルコリン(以下「GPC」と略記する)をアシルイミダゾールでアシル化する方法(Hermetterら, Chem. Phys. Lipids 28 111 (1981))、(2)N、N-ジメチル-4-アミノピリジン、N、N-ビロリジンピリジン等のエステル化触媒を用い、GPCを脂肪酸無水物でアシル化する方法(特公昭62-9599号公報)、(3)N、N-ジシクロヘキシルカルボジイミド等の縮合剤とN、N-ジメチル-4-4アミノピリジン等のエステル化触媒を用い、GPCを脂肪酸無水物でアシル化する方法(特開昭64-61489号公報)等が知られている。

(発明が解決しようとする問題点)

しかしながら、従来知られているこれらの製造法には種々の問題点がある。

例えば(1)の方法は、飽和脂肪酸残基以外の脂肪酸残基を有するホスファチジルコリンを製造することができず、反応熱の制御が困難で反応に長時間を要し、収率も低い。(2)の方法はGPCを粗体に保持させ、これを脂肪酸無水物と接触させて反応するものであるが、GPCを粗体に保持させる操作、反応後の粗体の分離操作等に複雑な工程を必要とし、収率も低い。(3)の方法は粉碎したGPCを脂肪酸無水物に添加するか、もしくは脂肪酸無水物中でGPCを微粉碎した後反応するもので、GPCが粉末状であるため脂肪酸無水物との接触が悪く、反応が遅いという欠点がある。

以上述べた様に従来の方法では、GPCにアシル基を導入するに際し、GPCとアシル基を導入する原料とが混融せず、従って反応速度が極めて遅くなり、反応に長時間を要し、かつ収率が低いという欠点があった。

本発明は上記の問題点に着目し、なされたもので、GPCと脂肪酸無水物とを用い、簡単な操作で、しかも反応時間が短く、ホスファチジルコリ

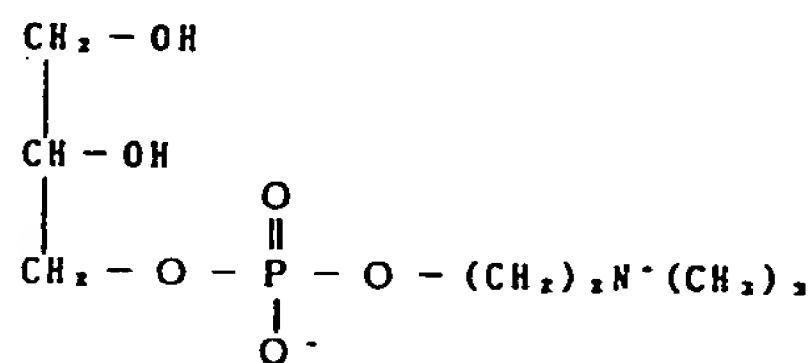
ンを高収率で製造することのできる方法を提供することを要旨とする。

(問題点を解決するための手段)

本発明者らは上記課題を解決するため総意研究を行なった結果、特定の溶媒を組み合わせて用いることにより、GPCを脂肪酸無水物に極めて微細に分散することができ、両者の接触面積が大きくて反応が速みやかに進行し、ホスファチジルコリンを高収率で得る方法を見いだし本発明に到った。

即ち本発明は、GPCと脂肪酸無水物とを低級アルコールに溶解した後、低級アルコールを留去し、次いで非プロトン性溶媒と塩基性触媒とを加えて反応するホスファチジルコリンの製造法である。

本発明に用いるGPCは下記一般式で表わされ、



大豆、卵黄、その他動植物油脂等から分離し、精製したレシチンを常法に従い加水分解して得られるGPCが挙げられる。

本発明に用いる脂肪酸無水物は、一般式 $(\text{RCO})_2\text{O}$ で表わされる（式中 R は炭素数 9 ~ 21 の飽和炭化水素基もしくは不飽和炭化水素基、又は芳香族炭化水素基を示す）脂肪酸無水物が挙げられ、脂肪酸と脂肪酸塩化物とを縮合する方法、脂肪酸塩と脂肪酸塩化物とを反応させる方法、脂肪酸を脱水する方法等の常法に従って得られた脂肪酸無水物を用いることができる。

上記脂肪酸無水物を構成する脂肪酸としては、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、ミリストリエン酸、パルミトレイン酸、オレイン酸、エライジン酸、リノール酸、リノレイン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、10, 12-オクタデカジエン酸、2, 4-オクタデカジエン酸、10, 12-ヘプタデカジエン酸、2, 4-オクタデカジエン酸、P-メチルフェニルブロ

ピオン酸、P-ビニルフェニルヘキサン酸等が挙げられ、これらの脂肪酸残基は単独もしくは組み合わせて用いられる。

本発明に用いられる低級アルコールとしては、メチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ブチルアルコール、sec-ブチルアルコール、tert-ブチルアルコール、アミルアルコール、イソアミルアルコール、ヘキシルアルコール、ヘプチルアルコール等が挙げられ、メチルアルコール、エチルアルコールが好ましい。

本発明に用いられる非プロトン性溶媒としては、脂肪酸無水物及び塩基性触媒を溶解または分散することのできる非プロトン性の溶媒が好ましく、例えばローベンタン、ローヘキサン、イソヘキサン、ローヘプタン、ローオクタン、イソオクタン、石油エーテル、シクロヘキサン、ベンゼン、トルエン、キシレン、塩化メチレン、クロロホルム、四塩化炭素、塩化エチレン、トリクロルエタン、クロルベンゼン、ジメチルスルホキシド、ジメチ

ルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、ローメチルピロリドン、ヘキサメチルホスホンアミド、メチルエチルケトン等が挙げられ、これらは単独もしくは2種以上を混合して用いることができる。

本発明に用いられる塩基性触媒としては、N,N-ジメチル-4-アミノピリジン、N,N-ジエチル-4-アミノ-2-メチルピリジン、N,N-ジブチル-4-アミノピリジン、N,N-ジブチル-4-アミノ-3-エチルピリジン、4-ビロリジノピリジン、4-ビロリジノ-2-メチルピリジン、4-ビロリジノ-3-ブチルピリジン、ピリジン、トリエチルアミン、トリブチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、トリオクチルアミン、トリブロピルアミン、トリイソブロピルアミン等が挙げられ、これらは単独もしくは混合して用いることができる。

本発明によりホスファチジルコリンを製造するには、まずGPC 1モルと脂肪酸無水物1~2モルとを低級アルコールに溶解する。低級アルコールの使用量は、GPCと脂肪酸無水物とを溶解で

きる量であれば良く、両者の合計量に対し、重量で1~5倍量が好ましい。上記溶解の操作において、各原料の添加順位はいずれが先であっても良く、また溶解に要する攪拌力は少なくて良く、通常の攪拌機を用いることができる。

GPCと脂肪酸無水物とが低級アルコールに溶解し、均一となったら次に低級アルコールを留去する。低級アルコールの留去は加热下に蒸留するか、減圧下もしくは減圧下に加热して行なうことができ、加热する場合GPC及び脂肪酸無水物の交渉を防ぐため100℃以下にて行なうことが望ましい。ここで低級アルコールを留去してもGPCおよび脂肪酸無水物のどちらも凝聚することなく、いずれか一方が他方に微細に分散した30℃で固体状もしくは液体状の混合物が得られる。

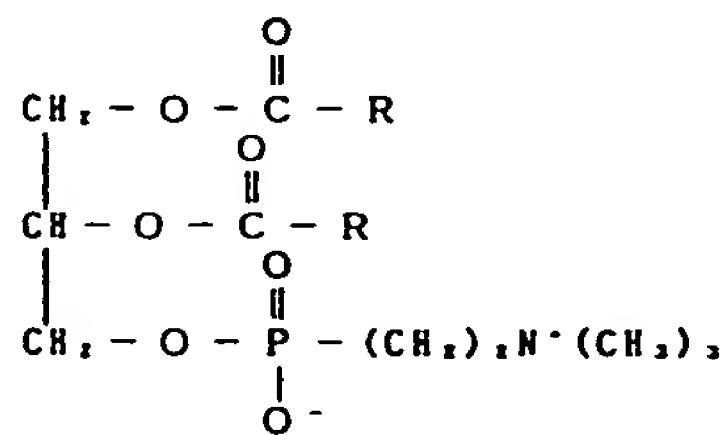
次に上記混合物に非プロトン性溶媒を加える。非プロトン性溶媒を加えると、脂肪酸無水物は非プロトン性溶媒に溶解し、GPCはその中に50ミクロン以下、主に20ミクロン以下の微細な粒子の状態で分散した分散液が得られる。ここに用いる

非プロトン性溶媒の量はGPCと脂肪酸無水物との合計量に対し、重量で3倍量以上が好ましい。

上記分散液に塩基性触媒を加え、アシル化反応を行なう。塩基性触媒の添加量はGPCに対し1~5重量%が好ましい。アシル化反応はチッ素ガス、ヘリウムガス、アルゴンガス等の不活性ガスの気流下、搅拌しながら0~70℃で2~12時間行なう。反応の進行に従い、分散液は白濁の状態から透明な状態となり、4~12時間で反応が完結する。

反応終了後、反応液を濃縮し、アセトンで洗浄を行なって塩基性触媒を除去し、アセトン不溶部をメタノール/クロロホルム系溶媒に溶解し、シリカゲルカラムを用いて分離精製し、高純度のホスファチジルコリンを得ることができる。

得られるホスファチジルコリンは下記一般式



(式中、Rは反応原料として用いた脂肪酸無水物の脂肪酸残基に同じ)で表わされる構造を有し、食品、化粧品、塗料等の乳化剤、医薬品におけるリポソームとしての薬物運搬体、人工血液、人工細胞等への応用、リン脂質を薄膜として用いる絶縁性膜、リン脂質の人工膜をフィルターに吸着させた化学センサー等に用いることができる。

以下実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はその要旨を超えない限り、これらに限定されない。

(実施例)

実施例1

300mlの攪拌機付きフラスコに、L-α-グリセロホスファチジルコリン10g(0.0388モル)、バルミチン酸無水物21.2g(0.0427モル)及びメタノール30gを仕込み、40℃に加热し溶解した。溶解後、減圧下70℃でメタノールを留去し、留去後さらに同温度で5時間減圧を行ない、乾燥した。乾燥後、脱水乾燥したクロロホルム100mlを加え、軽く攪拌すると白濁した溶液が得られた。次にこ

の溶液に4-ジメチルアミノピリジン 4.7 g (0.0427モル) を加え、チッ素ガス気流下、搅拌しながら50℃で5時間、アシル化反応を行なった。反応終了後、減圧下、40℃でクロロホルムを留去し、次いでアセトン 100mlを加え、1時間搅拌し、生成した結晶を漉別し、乾燥して29.5 g の結晶を得た。得られた結晶をクロロホルム/メタノール = 75/25の溶剤60mlに溶解し、シリカゲルカラムに吸着した後、クロロホルム/メタノール/水 = 65/25/4の溶離剤を用いて溶離し、溶離液を濃縮して、白色の結晶28.5 gを得た。得られた結晶は分析の結果、L-β, α-ジバルミトイール-α-ホスファチジルコリンであり、収率は95%であった。

得られた結晶のIR、NMR、TLCの各分析結果を、シグマ社製L-β, α-ジバルミトイール-α-ホスファチジルコリン標準試薬（純度99%）の分析結果と比較したところよく一致した。

実施例2

500 mlの搅拌機付きフラスコに、L-α-グリ

した。緩速度搅拌下、減圧下25℃でメタノールを留去し、次いで20℃で5時間減圧下に乾燥を行ない、残渣に脱水乾燥したクロロホルム 150mlを加えて溶解した。得られた溶液に4-ジメチルアミノピリジン 9.4 g (0.0854モル) を加え、チッ素ガス気流下、室温で12時間、反応を行なった。反応終了後、実施例1と同様に、脱溶媒、アセトン精製、シリカゲルカラム（溶媒 クロロホルム/メタノール = 75/25、溶離剤 クロロホルム/メタノール/水 = 65/25/4）により精製して、L-β, α-ジエイコサペンタエノイルホスファチジルコリンの白色結晶28 g (収率93%)を得た。

比較例1

300 mlの搅拌機付きフラスコに、50~100 メッシュに粉碎したL-α-グリセロホスホリルコリン10 g (0.0388モル)、バルミチン酸無水物21.2 g (0.0427モル)、脱水乾燥したクロロホルム 150ml、4-ジメチルアミノピリジン 9.5 g (0.0776モル) を加え、チッ素ガス気流下、50℃で急速搅拌を行ないながら10時間、反応を行なっ

セロホスホリルコリン20 g (0.0776モル)、ステアリン酸無水物44.2 g (0.0802モル) 及びメタノール 100 g を仕込み、50℃に加热し、溶解し、緩速搅拌下に実施例1と同様にしてメタノールを留去し、残渣に脱水乾燥したクロロホルム 200mlとジメチルスルホオキシド50mlを加えて溶解した。得られた溶液にN, N-ジメチル-4-アミノピリジン18.9 g (0.155 モル) を加え、チッ素ガス気流下、室温で8時間アシル化反応を行なった。反応終了後、実施例1と同様に、脱溶媒、アセトン精製、シリカゲルカラム（溶剤クロロホルム/メタノール = 75/25、溶離剤 クロロホルム/メタノール/水 = 65/28/5）により精製して、L-β, α-ジステアロイル-α-ホスファチジルコリンの白色結晶55.8 g (収率98%)を得た。

実施例3

300 mlの搅拌機付きフラスコに、L-α-グリセロホスホリルコリン10 g (0.0388モル)、エイコサペンタエン酸無水物25.8 g (0.044 モル) 及びメタノール 100 g を仕込み、25℃に加热し溶解

した。反応終了後、実施例1と同様に、脱溶媒、アセトン精製、シリカゲルカラムによる精製を行ない、L-β, α-ジバルミトイール-α-ホスファチジルコリンの白色結晶13.5 gを得た。収率は45%であった。

〔発明の効果〕

以上説明した様に、本発明はGPCと脂肪酸無水物を反応してホスファチジルコリンを製造する方法において、反応原料を低級アルコールに溶解して均一に混合した後、低級アルコールを留去し、非プロトン性溶媒、塩基性触媒を加えて反応を行なうもので、脂肪酸無水物を溶解した非プロトン性溶媒の溶液中にGPCが極めて微細な状態に分散しているため、従来の方法と比較して短時間で高い反応率の反応を行なうことができ、また粗体等を使用することがないので、反応後の精製が容易となり、かつ純度の高いホスファチジルコリンを高収率で得ることができる。また本発明の方法はGPCを分散する操作が簡単なため、複雑な工程や大規模な製造装置等を必要とせず、経済性に

優れる等の効果を有する。

特許出願人 ミヨシ油脂株式会社